

SG 1-Step PRO RT-qPCR KIT

REAL TIME qPCR PROTOKOLL

Beschreibung:

Der Kit besteht aus:

- dem *Master Enzyme Mix* mit einer speziell optimierten Reversen Transkriptase, einer "HotStart" DNA Polymerase (inhibiert durch einen hochaffinen, monoklonalen Antikörper), RNase Inhibitor sowie SYBR Green I Farbstoff;
- dem *qRT-PCR Master Buffer (2x)*, einem optimierten, universell anwendbaren Reaktionspuffer mit dNTPs (dTTP ist teilweise durch dUTP ersetzt). Der Puffer ist kompatibel zu den meisten, gebräuchlichen RealTime PCR Geräten,
- einer *thermolabilen Uracil-N-Glycosylase* (wird in einem separatem Reaktionsgefäß bereitgestellt, optional einsetzbare Komponente),
- *nukleasefreiem Wasser*.

Kit-Komponenten:

SG 1-Step RT-qPCR Master Mix (2x)

Komponente	Artikel Nr. E0825-01	Artikel Nr. E0825-02
	25 Reaktionen, je 25 µl, 500 µl [1x] Endvolumen	100 Reaktionen, je 25 µl, 2.0 ml [1x] Endvolumen
[2 x] PRO RT-qPCR SG Buffer	1 x 300 µl	2 x 600 µl
SG PRO Enzyme Mix	25 µl	100 µl
Thermolabile UNG (Uracil-N-Glycosylase) [1 U/µl]	10 µl	30 µl
Wasser, nukleasefrei	1 x 0.5 ml	2 x 1 ml

SG 1-Step RT-qPCR Master Mix (2x) plus ROX Solution

Komponente	Artikel Nr. E0826-01	Artikel Nr. E0826-02
	25 Reaktionen, je 20 µl, 500 µl [1x] Endvolumen	100 Reaktionen, je 20 µl, 2.0 ml [1x] Endvolumen
2. [2 x] PRO RT-qPCR SG Buffer	1 x 300 µl	2 x 600 µl
ROX Lösung, 25 µM	15 µl	60 µl
SG PRO Enzyme Mix	25 µl	100 µl
Thermolabile UNG (Uracil-N-Glycosylase) [1 U/µl]	10 µl	30 µl
Wasser, nukleasefrei	1 x 0.5 ml	2 x 1 ml

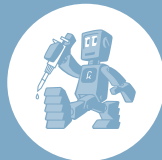
Lagerung:

Lagerung bei -20°C im Dunklen.

Das SG OneTube PRO RT-qPCR ist ein kombiniertes RT/qPCR-System, bestehend aus einer extrem thermostabilen Reversen Transkriptase und einer DNA Polymerase. Es erlaubt sensitive und präzise Echtzeit-Quantifizierung von RNA-Molekülen auf fast allen handelsüblichen Real-Time-PCR Geräten.

Kit-Komponenten:

- Der **SG PRO Enzymmix** enthält eine spezielle, sensitive und sehr thermostabile Reverse Transkriptase, eine "Proofreading"-DNA Polymerase, RNase Inhibitor und den interkalierenden Farbstoff SYBR Green I.
- **2x PRO RT-qPCR SG Puffer**, ein universeller Reaktionspuffer mit dNTPs (dTTP ist teilweise durch dUTP ersetzt, erlaubt optionalen UNG-Kontaminationsschutz mittels thermolabiler Uracil-N-Glycosylase).
- Die Reverse Transkriptase arbeitet in einem breiten Temperaturbereich zwischen 52°C bis 72°C ohne Verlust der Spezifität und der Sensitivität.
- cDNA Synthese und PCR werden in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt, mit genspezifischen Primern und totaler RNA bzw. mRNA.
- Korrekturleseaktivität ("Proofreading") finden sowohl während der cDNA-Synthese als auch während der PCR-Schritte statt.
- SYBR Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit Spezifität gegenüber doppelsträngiger DNA (dsDNA). Nach Bindung in dsDNA und Anregung durch Licht einer Wellenlänge von 494 nm ("excitation") wird Licht einer Wellenlänge von 521 nm emittiert. Das Lichtsignal der Wellenlänge von 521 nm kann auf allen marktüblichen RealTime Geräten detektiert werden und ist zu diesen kompatibel.
- Das Kit enthält eine thermolabile Uracil-N-Glycosylase (UNG), die in einem separaten Reaktionsgefäß geliefert wird und optional zum Kontaminationsschutz eingesetzt werden kann.
- Wenn qPCR Apparate von der Fa. Applied Biosystems eingesetzt werden, muss der passive Referenzfarbstoff ROX zwingend verwendet werden. Für manche Geräte der Fa. Stratagene kann ROX optional eingesetzt werden. Der SG 1-Step RT-qPCR Master Mix ist, je nach Bedarf, in zwei Varianten erhältlich, (1) ohne ROX und (2) mit ROX in einem separaten Reaktionsgefäß. Die unten aufgeführte Tabelle zeigt die empfohlenen Mengen an ROX für verschiedene qPCR Apparate.



SG 1-Step PRO RT-qPCR KIT

REAL TIME RT-qPCR PROTOKOLL (1)

qPCR- Protokoll

Für bestimmte Echtzeit-PCR-Geräte benötigte ROX-Volumina:

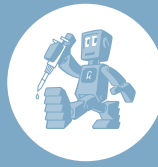
Instrument	Benötigte ROX-Menge je 25 µl Reaktion	Endgültige ROX-Konzentration
Applied Biosystems: 7300, 7900HT, StepOne, StepOnePlus, ABI PRISM 7000 und 7700	0,4 µl	500 nM
Applied Biosystems: 7500 Stratagene: Mx3000P, Mx3005P, Mx4000	0,4 µl 10 x verdünnt (in Wasser)	50 nM
Weitere Echtzeit-PCR-Geräte: Bio-Rad, Roche, Corbett, Eppendorf, Cepheid, etc.	Nicht benötigt	-

Hinweise zur Durchführung des qPCR Protokolls:

- Dunkel lagern.** SG 1-Step RT-qPCR Master Mix sowie ROX sollten vor Lichteinfluss geschützt werden, um einer vorzeitigen Einbuße der Signalintensität entgegenzuwirken.
- Minimierung der Gefrier-Auftau-Zyklen.** Die Anzahl an Gefrier-Auftau-Zyklen der Komponente [2 x] PRO RT-qPCR SG Buffer sollte minimiert werden. Sowohl SG Enzym Mix als auch ROX Lösung sollten auf Eis gelagert werden. Die Reaktionsansätze sollten generell so wenig Licht wie möglich ausgesetzt werden, um einer Einbuße der Fluoreszenzsignalintensität entgegenzuwirken.
- Konzentrationsunterschiede vermeiden.** [2 x] PRO RT-qPCR SG Buffer sollte vor Gebrauch vollständig aufgetaut und vorsichtig gevortext werden, um Konzentrationsunterschiede zu vermeiden.
- Empfohlenes Reaktionsvolumen 20 µl.** Für die Verwendung in den meisten qPCR-Analysegeräten empfehlen wir ein Reaktionsvolumen von 20 µl. Davon abweichend können auch andere Reaktionsvolumina verwendet werden, beispielsweise für den Einsatz in speziellen qPCR-Geräten.
- Die optimale Amplikonlänge** für RealTime-qPCR unter Verwendung von SYBR Green I ist 70 – 150 bp.
- Primer über Exon-Exon-Grenzen legen.** Um einer Amplifikation ggf. kontaminierender genomischer DNA entgegenzuwirken, empfiehlt es sich, nach Möglichkeit die Primer über Exon-Exon-Grenzen hinweg zu platzieren. Oft existieren spezielle, von Forschungsinstitutionen bereitgestellte Datenbanken, die eine Hilfestellung beim Design passender Primerpaare anbieten. Beispielsweise kann für *Homo sapiens* - spezifische Primerpaare die folgende Online-Datenbank verwendet werden: <http://primerdepot.nci.nih.gov/>
- Auf Eis pipettieren.** RT-qPCR Reaktionen sollten auf Eis zusammengefügt werden, um möglichen Degradationen der RNA-Vorlage ("Template") entgegenzuwirken.
- Pipettierreihenfolge.** Zunächst wird der Reaktions-Mastermix, bestehend aus Master Enzym Mix, qPCR Master Puffer, Primer und nukleasefreiem Wasser, sowie optional UNG und ROX gemischt und in die einzelnen PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt. Anschließend wird die RNA-Vorlage (weniger als 400 ng RNA je Reaktion oder weniger) zu den individuellen PCR-Reaktionsgefäßen gegeben. Die Reaktionsansätze sollten anschließend kurz zentrifugiert werden.
- Vor Analyse Luftblasen entfernen.** Vor Einsetzen der Proben in das qPCR-Gerät sollte optisch überprüft werden, ob Luftblasen in den einzelnen qPCR Reaktionsansätzen verblieben sind. Eventuell vorhandene Luftblasen stören die optische Detektion und sollten durch kurzes Zentrifugieren entfernt werden. Die Zentrifugation sollte so oft wiederholt werden, bis keine Luftblasen im Ansatz zurückbleiben. Anschließend werden die Proben in das qPCR Gerät überführt und die Analyse gestartet.
- Temperaturspezifikation der Reversen Transkriptase.** Die speziell für das Kit entwickelte Reverse Transkriptase arbeitet in einem Temperaturbereich zwischen 52°C und 72°C. Die empfohlene Starttemperatur für die Reverse Transkriptase ist 65°C. Für Experimente mit speziellen Anforderungen kann die Reaktionstemperatur innerhalb der Grenzen der o.g. Spezifikation problemlos angepasst werden.
- MgCl₂.** Die Standardkonzentration von MgCl₂ in Echtzeit- RT-qPCR-Reaktionen ist 3 mM (wie in 1 x konzentriertem qRT-PCR Master Buffer enthalten) - für die meisten PCR Reaktionen optimal. Wenn höhere MgCl₂-Konzentrationen benötigt werden, sollte eine 25 mM MgCl₂-Stammlösung hergestellt werden (kann bei Bestellung bei uns angefordert werden). 1 µl einer 25 mM MgCl₂-Lösung fügt 25 nmol zum Reaktionsansatz zu und erhöht damit die MgCl₂-Konzentration einer 25 µl- Reaktion um 1.0 mM.
- Primerkonzentration.** Die empfohlene Anfangskonzentration je Primer beträgt 0.3 – 0.5 µM, kann aber, je nach Reaktionsanforderungen, in einem Bereich zwischen 0.1 µM und 1.0 µM angepasst werden. 0.4 µM ist die empfohlene Anfangskonzentration. Wird die Primerkonzentration erhöht, kann die PCR-Effizienz steigen, aber die Spezifität der PCR-Reaktion nimmt ab. Eine Verminderung der Primerkonzentration senkt die PCR-Ausbeute und erhöht die Spezifität der Reaktion. Die optimale Primerkonzentration hängt sowohl von der einzelnen Reaktion als auch vom verwendeten Echtzeit-PCR-Gerät ab.
- Adjustieren des Schwellenwertes.** Der Detektionsschwellenwert ("threshold value") sollte vor jedem RT-qPCR Lauf neu adjustiert werden.
- Gefäß-Korrekturfaktor bestimmen.** Wird eines der Instrumente, Bio-Rad iCycler iQ oder MyiQ, eingesetzt, sollte am Anfang der Messung ein Gefäß-Korrekturfaktor ("well factor") bestimmt werden. Dieser Korrekturfaktor dient zur Korrektur für Variationen bei Fluoreszenzanregung oder zur Korrektur von Pipettierungenauigkeiten. Zur Bestimmung wird eine spezielle, externe "well factor" - Platte gemäß den Empfehlungen des Herstellers eingesetzt.

Ansetzen der PCR Reaktion:

Komponente	Volumen / Reaktion	Endkonzentration
2. [2 x] PRO RT-qPCR SG Buffer	10 µl	1 x
5'-Primer (Vorwärts)	Variabel	0,4 µM
3'-Primer (Revers)	Variabel	0,4 µM
Vorlagen-RNA	Variabel	max. 400 ng
SG PRO Enzyme Mix (als letzte Komponente zum Reaktions-Mastermix zufügen)	1 µl	1 µl pro Reaktion
Optional: ROX Lösung, 25 µM	0,4 µl oder 0,4 µl 10 x verdünnt	500 nM 50 nM
Optional: Thermostabile UNG (Uracil-N-Glycosylase) 1 U/µl	0,2 µl	0,2 U / Reaktion
Wasser, nukleasefrei	Auf 20 µl	-
Endvolumen	20 µl	-



SG 1-Step PRO RT-qPCR KIT

REALTIME RT-qPCR PROTOKOLL (2)

Programm für das Echtzeit-PCR-Gerät:

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl an Zyklen
Reverse Transkription	65°C	30 min	1
Einleitende Denaturatierung	98°C	20 s	1
Denaturierung	98°C	10 s	40-45
Primer-Bindung / Verlängerung / Datenerfassung	60°C	20 s	
Kühlschritt	4°C	Unbestimmt	1

1. **Optionale Komponente: Thermolabile UNG.** Es ist optional möglich, thermolabile Uracil-N Glycosylase (UNG) einzusetzen, um möglichen "carryover" - Kontaminationen vorzubeugen, etwa durch Verschleppung von PCR-Produkten aus vorher durchgeführten qPCR oder RT-qPCR-Analysen. qPCR-Amplikons oder RT-qPCR Produkte, die unter Verwendung eines der Produkte, SG qPCR Master Mix, Fast SG qPCR Master Mix oder SG 1-Step RT-qPCR Kit synthetisiert wurden, sind durch den teilweisen Einbau von Uracil- anstelle von Thymidin-Positionen "markiert". UNG entfernt Uracil von beliebigen dU-enthaltenden, verschleppten Amplifikationsprodukten und erzeugt basenfreie Positionen. Abasische Positionen ("abasic sites") sind Angriffspunkte für thermische Hydrolyse und Degradation unerwünschter DNA während des nachfolgenden Denaturierungsschrittes (95°C für 3 min). Achtung: UNG von E. Coli sollte auf keinen Fall verwendet werden, da diese nicht-thermolabile UNG jegliche neu synthetisierte cDNA degradieren würde.
2. **Thermolabile UNG, Inaktivierung.** Thermolabile UNG wird bei 50°C thermisch inaktiviert.
3. **Qualitätskontrolle - Schmelzkurvenanalyse.** Die Schmelzkurve sollte analysiert werden, um Spezifität und Identität des PCR-Produktes zu verifizieren. Entsprechende, leistungsfähige Routinen zur Schmelzkurvenanalyse sind Bestandteile der Programmausrüstung gängiger Echtzeit-PCR Geräte. Als Grundlage sollten die Daten für einen Temperaturbereich zwischen 65°C und 95°C herangezogen werden.
4. **Datenerfassung und Primer-Dimere.** Die Datenerfassung sollte während des Kettenverlängerungsschrittes ("extension") durchgeführt werden. Es besteht die Möglichkeit, verfälschende Fluoreszenzsignale aus unerwünschter Amplifikation von Primer-Dimeren zu unterdrücken, indem ein zusätzlicher Datenerfassungsschritt zum Protokoll hinzugefügt wird. Möglich ist das immer dann, wenn die Schmelztemperatur (T_m) des Primer-Dimeres deutlich niedriger als die T_m des spezifischen Produktes liegt. Die T_m wird durch die Schmelzkurvenanalyse berechnet. Während der Datenerfassung sollte die Temperatur über der T_m des Primer-Dimers liegen, aber etwa 3°C unterhalb der T_m des spezifischen Produktes.
5. **Qualitätskontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese.** Während der Entwicklung eines neuen PCR-Tests sollte die Spezifität des PCR-Produktes immer parallel durch Gelelektrophorese überprüft werden, da sich die Schmelzkurven von spezifischen und unerwünschten, unspezifischen Produkten (v.a. Primer-Dimere) überlappen können.